

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-518912

(P2021-518912A)

(43) 公表日 令和3年8月5日(2021.8.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483 F	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
	GO 1 N 33/53 U	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-557179 (P2020-557179)
 (86) (22) 出願日 平成31年4月10日 (2019. 4. 10)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月16日 (2020. 10. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2019/004259
 (87) 国際公開番号 W02019/203493
 (87) 国際公開日 令和1年10月24日 (2019. 10. 24)
 (31) 優先権主張番号 10-2018-0044218
 (32) 優先日 平成30年4月17日 (2018. 4. 17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(71) 出願人 510256159
 コリア リサーチ インスティテュート
 オブ ケミカル テクノロジー
 大韓民国 3 4 1 1 4 デジョン ユーソ
 ング カジヨンロー 1 4 1
 (74) 代理人 110000914
 特許業務法人 安富国際特許事務所
 (72) 発明者 イ, ギュホン
 大韓民国 5 6 2 1 2 チョルラブクート
 , チョンウプーシ, ペクハク 1-ギ
 ル, 3 0
 Fターム(参考) 2G045 AA25 FB05

最終頁に続く

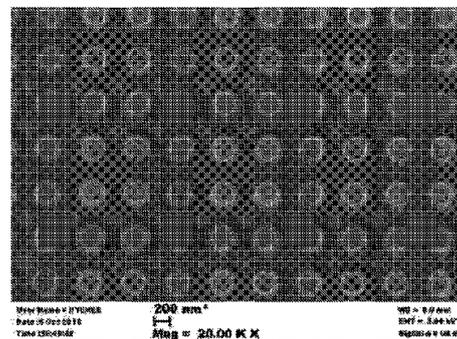
(54) 【発明の名称】 マルチウェル電極基盤のバイオセンサー

(57) 【要約】

【課題】マルチウェル電極基盤のバイオセンサーの提供。

【解決手段】本発明は、マルチウェル電極基盤のバイオセンサーに関するもので、アンペロメトリー (amp e r o m e t r y) 法を用いて、インピーダンス測定方法を通じた従来のバイオセンサーに比べ小型化することができ、免疫測定方式を組み合わせることによって、f g / m l 程度の感度を発揮して、血中の極めて微細な量で含まれている標的タンパク質を効果的に検出することができる。また、多数のウェルに異なるプローブを含むようにして、同時に様々な標的タンパク質を一度の過程を通じて検出することができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料を収容するための 1 乃至複数個のウェルが形成されている電極と、
上記電極上に提供される第 1 プローブ及び上記第 1 プローブに特異的に結合するアダプタータンパク質と、
上記第 1 プローブに結合する標的物質に特異的に結合する第 2 プローブと、
上記第 2 プローブに特異的に結合する信号仲介分子
を含むことを特徴とする電気化学的バイオセンサー。

【請求項 2】

上記電気化学的バイオセンサーは、アンペロメトリー (a m p e r o m e t r y) 法により、試料内のターゲット物質の濃度を測定することを特徴とする請求項 1 に記載の電気化学的バイオセンサー。

10

【請求項 3】

上記第 1 プローブは、ウェルの底部に露出された電極に固定されたアダプタータンパク質と特異的に結合することを特徴とする請求項 1 に記載の電気化学的バイオセンサー。

【請求項 4】

上記電極は、自己組織化単分子膜 (S e l f - a s s e m b l e d m o n o l a y e r ; S A M) で表面が改質されたことを特徴とする請求項 3 に記載の電気化学的バイオセンサー。

【請求項 5】

上記第 2 プローブは、タンパク質タグと結合され、
上記信号仲介分子は、上記タンパク質タグと特異的に結合するタンパク質と過酸化酵素が結合されることを特徴とする請求項 1 に記載の電気化学的バイオセンサー。

20

【請求項 6】

上記タンパク質タグは、ビオチン (B i o t i n)、カルモジュリン (C a l m o d u l i n)、F L A G、H i s、M y c、及び S B P (s t r e p t a v i d i n b i n d i n g p r o t e i n) で構成された群から選択される 1 種以上であることを特徴とする請求項 5 に記載の電気化学的バイオセンサー。

【請求項 7】

上記標的物質は、タンパク質またはペプチドであることを特徴とする請求項 1 に記載の電気化学的バイオセンサー。

30

【請求項 8】

電気化学的バイオセンサーを利用して、試料内の標的物質を検出する方法として、
上記電気化学的バイオセンサーは、試料を収容するための 1 乃至複数個のナノウェルが形成されている電極、上記ナノウェルの底部に提供される第 1 プローブ、及び上記第 1 プローブに特異的に結合するアダプタータンパク質を含み、
上記の方法は、
a) 上記電気化学的バイオセンサーに生物学的試料を入れて反応させる段階と、
b) 上記ナノウェルに標的物質をターゲットとする第 2 プローブを提供して反応させる段階と、
c) 上記ナノウェルに第 2 プローブに結合された標識物質をターゲットとする信号仲介分子を反応させる段階と、
d) 上記 c) 段階での第 2 プローブと信号仲介分子との間の反応は、電解質が存在する状態で、酸化還元反応により発生する電流を測定する段階
を含む、電気化学的バイオセンサーを利用して、試料内の標的物質を検出する方法。

40

【請求項 9】

上記電解質は、T M B (3 , 3 ' , 5 , 5 ' - T e t r a m e t h y l b e n z i d i n e)、E C L (E n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n c e) 及びヒドロキノン (H y d r o q u i n o n e) のうち 1 種以上を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、極微量の標的物質の検出において、感度が改善されたマルチウェル電極基盤のバイオセンサーに関するものである。

【背景技術】

【0002】

最近、微細試料を利用した新薬開発のためのスクリーニングプロセス、病気の診断などの分野で、バイオセンサーが注目され、研究開発が活発に行われているのが実情である。特に、血液、尿、唾液などの試料溶液の中に存在する微細な量の標的物質の存在や濃度を、現場で迅速かつ正確に測定するための小型バイオセンサーの開発が多く行われており、生体特異的な結合、免疫センサーまたはDNAセンサーなどがその例である。

10

【0003】

タンパク質を測定するために、従来は、主にELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を使用しており、これは抗体を支持体に固定化させて、上記抗体が固定化された表面に抗原タンパク質が混合されている試料溶液を一定時間反応させた後、上記の抗原タンパク質が結合された表面上に、抗原タンパク質と選択的に結合する感知用抗体を結合させた後、上記感知用抗体に酵素を結合させて、酵素が発色または蛍光特性を起こす反応物質を添加して、発色または蛍光反応が起きるようにすることにより、微量の抗原タンパク質を定量する方法である。ELISA法が現在まで、効果的に微量の抗原タンパク質を測定する方法として使用されているが、抗原タンパク質の分析範囲が少なく、一度に一つのタンパク質だけしか分析できないので、多量の試料 (200 μ l) を必要とし、pg/mlレベルの濃度では、正確な測定が難しいという欠点が存在する。

20

【0004】

そこで、最近ELISAの原理を利用して、バイオセンサー及びバイオチップに適用する過程を通じて簡便に抗原の濃度を測定することができる方法等が開発されている。その例として、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance、SPR)、水晶振動子マイクロバランス、電気化学センサーなどで測定する研究結果が存在する。このような方法は、試料内に存在する極微量の標的物質を簡便に検出することができるだけでなく、様々な種類の抗原を同時に検出できるという利点が存在する。しかし、上記の方法は、ELISA法に比べ感度が大幅に改善されていない結果となっており、極微量の標的物質を検出するために、感度が改善されたバイオセンサーの研究開発が必要な実情である。

30

【0005】

併せて、有害物質吸入による肺損傷と、それから誘発される心血管の損傷を測定するためには、一般的にTNF- α 、TGF- β 、IFN- γ などのサイトカインを測定するものの、血液内で10乃至400 pg/mlの極めて低い濃度で存在し、センシングが難しいという問題があり、このような感度が改善されたバイオセンサーの研究開発が必要な実情である。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の一目的は、マルチウェルバイオセンサーを提供することである。

【0007】

本発明の他の目的は、上記バイオセンサーを利用して、試料内の標的物質を検出する方法を提供することである。

【0008】

本発明の他の目的は、本発明に係る上記バイオセンサーの製造方法を提供することである。

50

【0009】

しかし、本発明が解決しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に限定されず、言及されていない他の課題は、以下の記載から当業界で通常の知識を有する者に明確に理解されるだろう。

【課題を解決するための手段】

【0010】

試料を収容するための1乃至複数個のウェル(nanowell)が形成されている電極と、上記電極上に提供される第1プローブ及び上記第1プローブに特異的に結合するアダプタータンパク質と、上記第1プローブに結合する標的物質に特異的に結合する第2プローブと、上記第2プローブに特異的に結合する信号仲介分子を含むことを特徴とする電気化学的バイオセンサーを提供する。

10

【0011】

また、本発明において、上記電気化学的バイオセンサーは、アンペロメトリー(ampereometry)法により、試料内のターゲット物質の濃度を測定するものであることができる。

【0012】

また、本発明において、上記電極に結合されるアダプタータンパク質は、上記ウェル内に存在するように、電極に結合するものであることができる。

【0013】

また、本発明において、上記第1プローブは、ウェルの底部に露出された電極に固定されたアダプタータンパク質と特異的に結合するものであることができる。

20

【0014】

また、本発明において、上記電極は、自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer; SAM)で改質されたものであることができる。

【0015】

また、本発明において、上記第2プローブは、タンパク質タグと結合され、上記信号仲介分子は、過酸化酵素と結合されるものであることができる。

【0016】

また、本発明において、上記信号仲介分子は、第2プローブのタンパク質タグと結合されるものであることができる。

30

【0017】

また、本発明において、上記タンパク質タグは、ビオチン(Biotin)、カルモジュリン(Calmodulin)、FLAG、His、Myc、及びSBP(streptavidin binding protein)で構成された群から選択される1種以上のものであることができる。

【0018】

また、本発明において、上記標的物質は、タンパク質またはペプチドであることができる。

【0019】

本発明の他の実施例は、電気化学的バイオセンサーを利用して、試料内の標的物質を検出する方法として、

40

上記電気化学的バイオセンサーは、試料を収容するための1乃至複数個のウェルが形成されている電極、上記ウェルの底部に提供される第1プローブ、及び上記第1プローブに特異的に結合するアダプタータンパク質を含み、

上記の方法は、

a) 上記電気化学的バイオセンサーに個体から分離された生物学的試料を入れて反応させる段階と、

b) 上記ウェルに標的物質をターゲットとする第2プローブを提供して反応させる段階と、

c) 上記ウェルに第2プローブを標識する物質をターゲットとする信号仲介分子を反応さ

50

せる段階と、

d) 上記c) 段階での第2プローブと信号仲介分子との間の反応は、電解質が存在する状態で、酸化還元反応により発生する電流を測定する段階を含む、電気化学的バイオセンサーを利用して、試料内の標的物質を検出する方法を提供する。

【0020】

また、本発明において、上記d) 段階の電解質は、TMB (3, 3', 5, 5' - Tetramethylbenzidine)、ECL (Enhanced chemiluminescence) 及びヒドロキノン (Hydroquinone) のうち1種以上を含むことができる。

【発明の効果】

10

【0021】

本発明に係るバイオセンサーは、アンペロメトリー (amperometry) 法を利用し、インピーダンス測定方法を通じた従来のバイオセンサーに比べて小型化することができ、免疫測定方式を組み合わせることにより、 fg/ml の程度の感度を発揮して血中の極めて微細な量で含まれている標的タンパク質を非常に効果的に検出することができる。

【0022】

また、多数のウェルにそれぞれ異なるプローブを含むようにして、同時に様々な標的タンパク質を一度の過程を通じて検出することができる。

【0023】

併せて、特定電圧をかけて電流を測定する酸化還元方法を利用することで、分析時間が5秒以内と非常に短い。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】本発明の一実施形態に係るバイオセンサーのナノサイズの直径を有するウェルの模式図を示したものである。

【図2】本発明の一実施形態に係るバイオセンサーの模式図を示したものである。

【図3】本発明の一実施形態に係るバイオセンサーの模式図を示したものである。

【図4】本発明の一実施形態に係るバイオセンサー製作及び検出過程を示したものである。

【図5】本発明の一実施形態に係るバイオセンサー及びELISAを利用したMCP-1タンパク質の測定グラフを示したものである。

30

【図6】本発明の一実施形態に係るナノウェルバイオセンサー及び平面の電極を利用したTGF- β の量を測定したグラフを示したものである。

【図7】本発明の一実施形態に係るナノウェルバイオセンサー (TGF- β) を利用して、様々なタンパク質 $1ng/ml$ あたりに発生する電流を測定したグラフを示したものである。

【図8】本発明の一実施形態に係るナノウェルバイオセンサー (IL-6) を利用して、様々なタンパク質 $1ng/ml$ あたりに発生する電流を測定したグラフを示したものである。

【図9】本発明の一実施形態に係るナノウェルバイオセンサー (MCP-1) を利用して、様々なタンパク質 $1ng/ml$ あたりに発生する電流を測定したグラフを示したものである。

40

【図10】総IgE (total immunoglobulin E) をマーカーに、PBS bufferで濃度別クロノアンペロメトリー (chronoamperometry) を実行したグラフを示したものである。

【図11】総IgEの濃度による電流値を計算して作成された、 pg 乃至 ng の範囲で指数曲線を示す較正曲線 (calibration curve) を示したものである。

【図12】対照群 (未処理群) のマウスについて、時間によるIgEレベルを、本発明のバイオセンサーを利用して測定した結果を示したものである。

【図13】OVA (Ovalbumin) を感作させ、これを吸引させて喘息及び気道炎

50

症を誘発した実験群で、サイトカイン I L - 4 の変化を、本発明のバイオセンサーを利用して、二日おきに測定した結果を示したものである。

【図 1 4】O V A を感作させ、これを吸引させて喘息と気道炎症を誘発した実験群でサイトカイン I g E の変化を、本発明のバイオセンサーを利用して、二日おきに測定した結果を示したものである。

【図 1 5】ナノウェルアレイ電極を有するバイオセンサーの製造過程を示したものである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 5 】

以下、添付された図面を参照して、本発明の望ましい実施形態等を説明する。しかし、本発明の実施形態は、様々な形態に変形することができ、本発明の範囲が以下で説明する実施形態に限定されるものではない。また、本発明の実施形態は、当該技術分野で平均的な知識を有する者に本発明をより完全に説明するために提供するものである。

10

【 0 0 2 6 】

本発明者らは、従来 E L I S A 方式において、試料内に含まれている極微量の標的物質を検出するにあたり、さらに感度 (s e n s i t i v i t y) が高いバイオセンサーを開発しようと努力した結果、直径がマイクロまたはナノサイズの円筒形のウェルが形成されている電極を有するバイオセンサーが、タンパク質タグが結合された第 2 プローブ及び第 2 プローブに特異的に結合できる信号仲介分子を含む場合、試料内の標的物質の測定感度を著しく高めることができることを発見し、本発明を完成するに至った。

20

【 0 0 2 7 】

本発明において、一実施例として、バイオセンサーは、図 1 5 での製造過程を通じて得られるナノウェルアレイ電極を有するバイオセンサーであることができる。一例として、ナノウェルは、現在知られている様々なナノウェル形成方法を適用することができ、例えば、シリコンウェハ基盤のナノウェル構造体をパターニングする技術などを適用することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明は、試料を収容するための 1 乃至複数個のウェル (n a n o w e l l) が形成されている電極と、上記電極上に提供される第 1 プローブ及び上記第 1 プローブに特異的に結合するアダプタータンパク質と、上記第 1 プローブに結合する標的物質に特異的に結合する第 2 プローブと、上記第 2 プローブに特異的に結合する信号仲介分子を含むことを特徴とする電気化学的バイオセンサーに関するものである。以下、本発明に係るバイオセンサーの各構成を図面をもとに詳細に説明する。

30

【 0 0 2 9 】

試料を収容するための 1 乃至複数個のウェルを含む電極 (1 0 0) :

【 0 0 3 0 】

電極配線に、標的物質を検出するために、試料内に発生される電子を検出する構成に該当する。

【 0 0 3 1 】

本発明において、上記電極は、C u、N i、F e、P t 及び A u のうち 1 種以上であることができ、望ましくは A u であるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 0 3 2 】

図 2 に示すように、また、本発明において、上記電極の表面は、第 1 プローブ及びアダプタータンパク質の結合を容易にするために、表面が改質されたもの (2 0 0) であることができる。具体的には、上記表面の改質は、自己組織化単分子膜 (S e l f - a s s e m b l e d m o n o l a y e r ; S A M) で改質されたものであることができる。上記自己組織化単分子膜で電極の表面を改質する場合には、第 1 プローブ (4 0 0) 及びアダプタータンパク質 (3 0 0) の共有結合を安定的に誘導することにより、安定性、再現性、及び感度を顕著に高めることができる。

【 0 0 3 3 】

50

また、図 1 に示すように、本発明において、上記 1 乃至複数個のウェルは、マイクロ乃至はナノサイズの直径を有するウェル構造体であり、円筒形のウェルであることができる。このように、マイクロ乃至はナノサイズの直径を有する場合には、目的とする個体から分離された、またはその他の方法で得られる生物学的試料内に含まれている標的物質以外のアルブミン (Albumin) のような巨大分子タンパク質などを濾過する効果を発揮することができる。また、円筒形ウェルの形態を有する場合には、そうでない場合に比べて下記の式 1 による際、電子伝達の拡散を極大化して、極微量の試料を効率的に検出することができる。

【0034】

【数 1】

[式 1]

$$I_{\text{lim}} = \frac{4\pi n F c^b D r^2}{4L + \pi r}$$

【0035】

望ましくは、上記ウェルのサイズは、50 乃至 500 nm の直径であることができ、200 乃至 500 nm の直径であることができ、例えば、300 乃至 400 nm の直径であることができるが、これらに限定されない。上記円筒形ウェルの直径が 50 nm 未満である場合は、抗体がウェル内に固定されにくく、直径が 200 nm 未満である場合には、内部に測定のための電子伝達の拡散が極大化できず、500 nm 超過の場合には、標的物質以外の不要なタンパク質を充分にろ過することができない。

【0036】

第 1 プローブ及びアダプタータンパク質：

【0037】

アダプタータンパク質は、目的とする試料内に存在する標的物質 (500) を最初に捕獲する第 1 プローブ (400) と電極との間の結合を容易にする構成に該当する。

【0038】

本発明において、上記第 1 プローブ (400) は、試料内に存在する標的物質に特異的に結合できる分子であればすべて含むことができ、具体的に標的物質に特異的に結合する抗体、タンパク質、その他の生体分子などであることができるが、これらに限定されない。

【0039】

また、本発明において、上記アダプタータンパク質 (300) は、抗体、タンパク質などの第 1 プローブを固定化できるものであればすべて含むことができ、具体的にタンパク質 A、タンパク質 G 又はストレプトアビジン (Streptavidin) 等であるが、これに限定されない。このように、第 1 プローブが電極に直接結合されずにアダプタータンパク質に結合される場合、第 1 プローブと電極との間の固定効率を著しく増加させ、非特異的反応を抑えることができる。

【0040】

ただし、本発明において、上記「標的物質 (500)」は、目的とする個体から分離された生物学的試料内に含まれている測定のためのペプチド又はタンパク質であることができる。

【0041】

本発明において、上記の「ペプチド」は、ポリペプチドを含み、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質という用語は、アミノ酸残基の重合体を意味する。一つ以上のアミノ酸残基のような自然発生的なアミノ酸のみならず、自然発生のアミノ酸の重合体が人工化学的に合成されたアナログであるときも、本発明の範囲に含まれる。

【0042】

本発明の目的上、上記標的物質は、試料内の極微量含まれているタンパク質であるサイトカインタンパク質であることができ、望ましくは、上記サイトカインタンパク質は、イン

10

20

30

40

50

ターロイキン (Interleukin)、TGF-アルファ (alpha)、TGF-ベータ (beta)、インターロイキン-4、インターロイキン-6、MCP-1、インターロイキン-1-ベータ (beta)、インターロイキン-17及びIFN-ガンマ (gamma) などであることができる。

【0043】

図3に示すように、本発明の一実施例は、上記第1プローブによって捕獲された標的物質に特異的に結合する第2プローブ及び第2プローブに特異的に結合する信号仲介分子をさらに含むバイオセンサーに関するものであることができる。

【0044】

第2プローブ：

【0045】

第1プローブによって捕獲される標的物質に特異的に結合する構成に該当する。

【0046】

本発明において、上記第2プローブ(601)は、標的物質(500)に特異的に結合できる分子であればすべて含むことができ、具体的にタンパク質、抗体などであるが、これらに限定されない。また、本発明で、上記第2プローブは、タンパク質タグ(602)が結合されたものであることができる、

【0047】

本発明において、上記タンパク質タグは、ビオチン(Biotin)、カルモジュリン(Calmodulin)、FLAG、His、Myc、及びSBP(streptavidin binding protein)で構成された群から選択される1種以上のものであることができ、望ましくは、ビオチンであるが、これらに限定されるものではない。

【0048】

信号仲介分子：

【0049】

第2プローブに特異的に結合して酸化還元反応を起こし、電流を発生させることで標的物質の存否を確認させる構成に該当する。

【0050】

本発明において、上記信号仲介分子(700)は、第2プローブに直接結合したり、第2プローブのタンパク質タグに特異的に結合したりするタンパク質(701)に、酸化還元反応を通じて電流を発生させる物質が結合された物質(702)であればすべて含むことができる。望ましくは、上記タンパク質タグがビオチンである場合、ビオチン1分子に1つの分子が結合できるストレプトアビジンに、過酸化酵素(horseradish peroxidase)が結合された物質であることができる。このように、ビオチンと1:1で結合できるストレプトアビジン(Streptavidin)に過酸化酵素が結合された信号仲介分子を含む場合、標的物質に結合されている第2プローブに特異的に結合することにより、標的物質に対する定量的測定において、感度及び正確度を顕著に高めることができる。

【0051】

本発明の他の実施例では、

電気化学的バイオセンサーを利用して、試料内の標的物質を検出する方法として、上記電気化学的バイオセンサーは、基板上に、試料を収容するための1乃至複数個のウェルが形成されている電極、上記ウェルの底部に提供される第1プローブ、及び上記第1プローブに特異的に結合するアダプタータンパク質を含み、上記方法は、

a)上記電気化学的バイオセンサーに個体から分離された生物学的試料を入れて反応させる段階と、b)上記ウェルに標的物質をターゲットにする第2プローブを提供して反応させる段階と、c)上記ウェルに第2プローブに結合された標識物質をターゲットにする信号仲介分子を反応させる段階と、d)上記c)段階での第2プローブと信号仲介分子との間の反応は、電解質が存在する状態で、酸化還元反応により発生する電流を測定する段階

10

20

30

40

50

を含む、電気化学的バイオセンサーを利用して、試料内の標的物質を検出する方法を提供する。

【0052】

本発明において、上記「標的物質」は、目的とする個体から分離された生物学的試料内に含まれている測定のための蛋白質又はペプチドであることができる。本発明の目的上、上記標的物質は、試料内に極微量含まれているタンパク質であるサイトカインタンパク質であることができ、望ましくは、上記サイトカインタンパク質は、インターロイキン (Interleukin)、TGF-アルファ (alpha)、TGF-ベータ (beta)、インターロイキン-4、インターロイキン-6、MCP-1、インターロイキン-1-ベータ (beta)、インターロイキン-17及びIFN-ガンマ (gamma) など

10

【0053】

本発明の上記「目的とする個体」とは、試料内の標的物質の存在または定量的数値を測定するための個体を意味する。また、本発明において、上記個体から得られた「生物学的試料」とは、本発明に係る上記標的物質に該当する遺伝子、タンパク質、および/またはマイクロRNAなどが存在する組織、組織のライセート (lysate)、気管支肺胞洗浄液、細胞、血液、血清、血漿、唾液、喀痰、脳脊髄液、糞便又は尿といった試料などを含むが、このような測定しようとする標的物質が含まれている試料であれば、どのような種類でもすべて含まれる。

【0054】

本発明の一実施例では、上記c)段階で、第2プローブと信号仲介分子との間の反応は、電解質が存在する状態で、酸化還元反応により発生する電流を測定することができる。望ましくは、上記電解質は、(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)、ECL (Enhanced chemiluminescence)及びヒドロキノン (Hydroquinone)のうち1種以上を含むことができ、さらに望ましくはTMBであることができるが、これに制限されるものではない。このように、第2プローブと信号仲介分子との間の反応が、電解質が存在する状態で、酸化還元反応を通じて発生する電子により発生する電流を測定する場合、従来に使用されたインピーダンス測定方法と比較して交流電圧装置を追加することなく、センサーの簡素化が可能であり、測定限界度及び感度が著しく向上することにより、fg/mlに該当する標的物質を検出

20

30

【0055】

また、本発明において、上記ウェルに含まれる第1プローブは、ウェルごとに異なるプローブを含むようにして、同時に様々な標的物質を一度の過程を通じて検出することもできる。

【0056】

また、別の観点から、本発明のもう一つの実施例では、電極の表面を改質する段階と、上記電極上に1乃至複数個のウェルを形成させる段階と、上記改質された電極にアダプタータンパク質及び第1プローブを結合する段階を含むバイオセンサーの製造方法を提供する。

40

【0057】

本発明のバイオセンサーの製造方法において、上記電極、第1プローブ、アダプタータンパク質、第2プローブに関する内容は、上記バイオセンサーに記載したものと重複しており、以下、具体的な記載を省略する。

【実施例】

【0058】

以下、具体的な実施例を通じて本発明をさらに具体的に説明する。下記の実施例は、本発明の理解を助けるための例示に過ぎず、本発明の範囲がこれに限定されるものではない。

【0059】

[製造例] バイオセンサーの製造

50

【0060】

Journal of Biotechnology 168, 584 - 588, 2013に記載されたナノウェル形成方法を参考にして、金の電極表面にレーザーを利用して、300乃至400nmの直径を有する複数個のナノウェルをアレイ型に形成した(図1)。

【0061】

具体的には、上記電極は、2x4mmのシリコンウェハ上にシリコン酸化膜をプラズマ化学気相蒸着法で形成して(10nm)、電気がよく通る物質でバイオ親和性金属であるAu層を電子ビーム蒸着法(e-beam evaporation)で50nmの厚さに形成した。このように生成されたゴールド層の上に微細ナノウェルを形成するために、半導体工程であるリソグラフィ方法を適用した。そのために、まず、第1感光層であるPR(photoresist)を1umで塗布して形成した。塗布層の厚さは、薄すぎると微細パターン形成が容易でなく、厚すぎると工程が終わって完全に削除されないため、エッチング選択比を考慮して、100nmの厚さに形成した。このようにPR層を形成した後、電子ビームリソグラフィ(E-beam lithography)工程を利用して、200nmの直径を有する丸い円構造の微細パターンを形成した。この時、e-beam powerの大きさによって円構造の直径のナノからマイクロサイズまでの調整が可能である。エッチング(lithography)工程が終了した後に残ったPR(日本ゼオン株式会社)及び絶縁層を除去するために形成された電極をアセトン(ACETON)に浸漬させた後、超音波を利用して除去した。このように生成された電極は、酸化防止のために、個々の真空包装をして恒温恒湿機に保管し、使用する直前に、純水(Deionized water)で洗浄した後、使用した。

10

20

【0062】

以降は、図4に示すように、金の電極に形成されたウェルの内部の表面を親水性化し、タンパク質等との共有結合を誘導するにあたって、安全性、再現性および感受性を高めるために自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer; SAM)改質をするために11-mercaptopundecanoic acidを利用して1時間反応させた。その後、1Mエタノールアミン(ethanolamine)で10分間反応して、反応が起こらない自己組織化単分子膜物質を除去した。このように得られた多数の改質された多数のウェルを有する金の電極に、アダプタータンパク質に該当するタンパク質A(protein A)を抗体の固定化のために結合させた。その後、測定しようとする標的物質に特異的に結合する抗体である第1プローブを上記タンパク質Aに1時間反応させて結合を誘導して電極を形成した。

30

【0063】

また、標的物質と直接結合する第2プローブは、ビオチン化(Biotinylation)させて準備し、第2プローブに結合されたビオチンに結合する信号仲介分子は、ストレプトアビジン(Streptavidin)にHRP(Horse peroxidase)が結合された物質を準備してから、バイオセンサーを利用した測定に使用した。

【0064】

[実験例1と比較例1]バイオセンサーを利用した標的物質の測定及びELISA法との比較

40

【0065】

第1プローブ及び第2プローブをMCP-1に特異的な抗体(R&D Systems社で購入)を利用して作ったバイオセンサーを用いた。

【0066】

上記第1プローブのそれぞれを、ナノウェルにそれぞれ結合させた後、非特異的な結合を防止するためにBSA 1mg/mlに30分間反応させた。その後、それぞれの第1プローブの抗体に該当する抗原であるMCP-1タンパク質それぞれをウェルに入れ、30分間反応させた。その後、上記ビオチン化された第2プローブと45分間反応させ、ストレプトアビジンにHRPが結合された信号仲介分子と15分間反応させた。その後、電解

50

質に該当する T M B 溶液を入れた後、時間に応じた電流を測定し、その値を図 5 に示した。ただし、E L I S A 方式は、上記 M C P - 1 抗原及びそれに特異的な抗体を用いて公知の通常の方法によって測定した。

【 0 0 6 7 】

図 5 に示すように、本発明に係るバイオセンサーで測定した場合、測定限界値が 10^{-17} g / m l に該当し、 10^{-17} から 10^{-11} までの広い範囲の濃度を測定することができる反面、E L I S A 法の場合、測定限界値が 10^{-12} g / m l に該当し、 10^{-9} g / m l の比較的短い範囲の濃度内で測定された。

【 0 0 6 8 】

上記の結果を通じて、本発明に係るバイオセンサーは、極めて微細な量 (5 u l 以下のサンプル消費量) のタンパク質を検出することができるだけでなく、広い範囲に該当する濃度まで測定できるという効果が存在することがわかる。

10

【 0 0 6 9 】

[比較例 2] ナノウェル電極及び一般電極バイオセンサーの感度比較

【 0 0 7 0 】

本発明に係るウェルは、特にナノサイズの直径を有するウェルがある電極と、このようなウェルが存在しない電極で感度を比較した。

【 0 0 7 1 】

本発明に係るナノサイズの直径を有する上記製造例 1 のバイオセンサーと、一般的に使用することができるウェルが含まれていない平面の電極にプローブを固定させて測定するセンサーを利用して、T G F - b e t a について、上記の実験例 1 及び比較例 1 のように測定し、その結果を図 6 に示した。

20

【 0 0 7 2 】

図 6 に示すように、ナノサイズの直径を有する製造例 1 のバイオセンサーの場合、T G F - b e t a のタンパク質の量が増加するほど、電流の差が比例して増加するのに対し、平面の電極では、 10^{-15} 乃至 10^{-13} g / m l では電流の差の変化が存在しなかった。

【 0 0 7 3 】

上記の結果を通じて、本発明に係るバイオセンサーは、平面の電極を有する場合に比べて、低い濃度を区別する感度が顕著に高くなることが分かる。

30

【 0 0 7 4 】

[比較例 3] 標的物質間の感度 (特異性) の測定比較

【 0 0 7 5 】

本発明に係るバイオセンサーを利用して、選択的な抗原のみを特異的に探知する信号を確認した。

【 0 0 7 6 】

上記製造例 1 のバイオセンサーに、第 1 プローブを T G F - b e t a に特異的な抗体 (R & D S y s t e m s 社で購入) を使用し、対照群に M C P - 1、I L - 4、I L - 1 b e t a、I L - 6、I L - 1 7、I N F - g a m m a 及び L e p t i n、B S A 及びバッファーを使用して、それぞれ 1 n g / m l の濃度を処理した後、発生する電流を測定して図 7 に示した。

40

【 0 0 7 7 】

図 7 に示すように、他の抗原が約 1 0 u A の電流の強さを示すのに対し、T G F - b e t a は 1 n g / m l の場合、6 5 u A の電流の強さを示した。

【 0 0 7 8 】

それだけでなく、他の特異的な抗体を電極にコーティングしたときにも、その抗体に特異的に結合するタンパク質のみが大きな電流強度の変化を見せることを確認した。このような方法で、図 8 に示すように、I L - 6 に特異的な抗体 (R & D S y s t e m s 社で購入) を使用して、M C P - 1、T G F - b e t a、及びバッファーを使用して 1 n g / m l で処理した結果、当該タンパク質、つまり、I L - 6 でのみ特異的に大きな電流強度の

50

変化を見せることを確認した。

【0079】

図9でも示すように、MCP-1に特異的な抗体(R&D Systems社で購入)を使用して、IL-6、TGF-beta、及びバッファーを使用して1ng/mlで処理した結果、当該タンパク質、つまり、MCP-1でのみ特異的に大きな電流強度の変化を見せることを確認した。

【0080】

[実験例2] 較正曲線(Calibration curve)作成

【0081】

較正曲線(Calibration curve)の作成に使用されたマーカーは、総IgE(total immunoglobulin E)で、IgEは、炎症性損傷モデルでそのレベルが急激に増加することになる蛋白質である。まず、IgEの定量のためにPBS bufferで濃度別にクロノアンペロメトリー(chronoamperometry)を行い(図10)、これにより、それぞれの濃度に応じた電流値を計算してcalibration curveを完成した。その結果、pg乃至ngの範囲で指数曲線(exponential curve)にフィッティングされることを確認した(図11)。

10

【0082】

[比較例4] 対照群(未処理群)及びOVA(ovalbumin)投与群でIgE又はIL-4の測定比較

20

【0083】

上記実験例2で完成されたcalibration curve定量を基に、実際のマウスモデルから総IgEレベルを測定した。従来の上記ELISA法の場合、約100乃至200µlの多量の試料(例えば、血液)を必要とし、測定時に動物(マウス)を犠牲にせざるを得ず、持続的なモニタリングが不可能だったのに対し、本発明のバイオセンサーは、fg/mlの程度の感度を発揮して、動物を犠牲にせずに取得した極少量の試料から目的のタンパク質を効果的に検出することができ、これにより、持続的なモニタリングも可能である。

【0084】

まず、何の処理もしていない対照群のマウスに対し、本発明のバイオセンサー及び検出方法を利用して、IgEレベルを測定した結果、持続的なモニタリングにより、時間の経過によるIgE濃度に差がないことを確認した(図12)。一方、実験群の場合、薬物点滴器にOVA(Ovalbumin)を感作させ、これを吸引させて喘息(asthma)及び気道炎症を誘発し、これによって増加する代表的なサイトカインであるIL-4及びIgEの変化を二日おきに確認した。その結果、本発明のバイオセンサーは、時間の経過に応じてIL-4及びIgE濃度の変化レベル及び経過を正確に確認することができ(図13及び14)、これは従来の上記ELISA法と異なり、増加した感度による持続的なモニタリングが可能であることを示す結果である。

30

【0085】

以上、本発明の実施例について詳細に説明したが、本発明の権利範囲はこれに限定されるものではなく、請求の範囲に記載された本発明の技術的思想を脱しない範囲内で、多様な修正及び変形が可能であることは、当該技術分野の通常の知識を有する者には自明であるだろう。

40

【符号の説明】

【0086】

100: 電極

200: 改質層

300: アダプタータンパク質

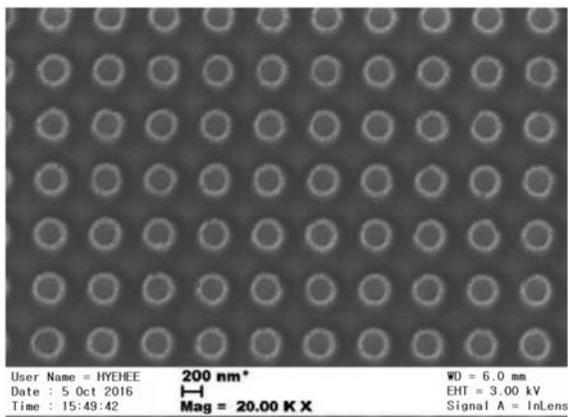
400: 第1プローブ

500: 標的タンパク質

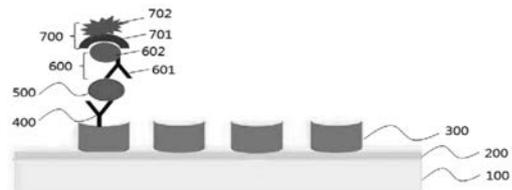
50

- 600 : タンパク質タグが結合された第2プローブ
- 601 : 第2プローブ
- 602 : タンパク質タグ
- 700 : 過酸化酵素が結合された信号仲介分子
- 701 : タンパク質タグに特異的に結合するタンパク質
- 702 : 酸化還元反応を通じて電流を発生させることができる物質 (例えば、過酸化酵素)

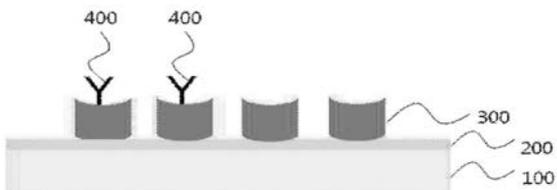
【図1】



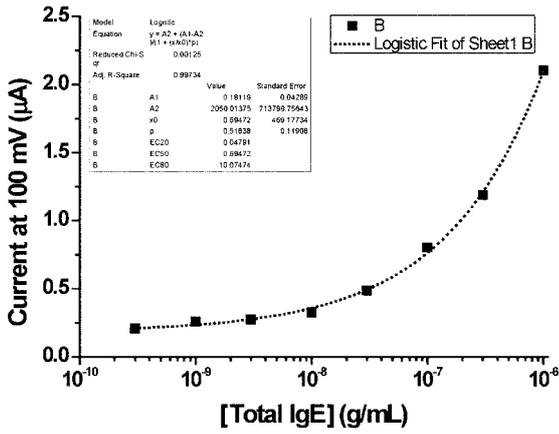
【図3】



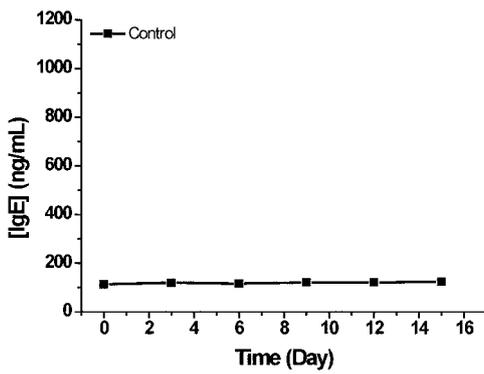
【図2】



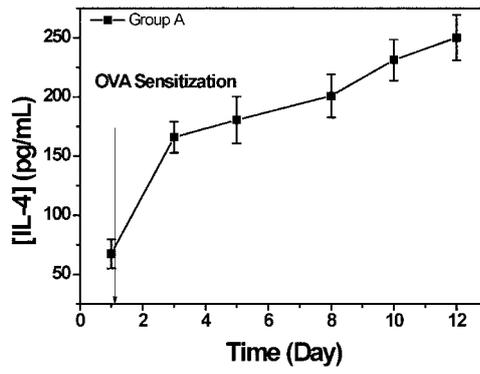
【 図 1 1 】



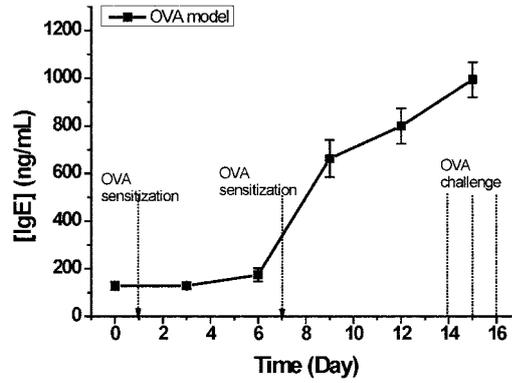
【 図 1 2 】



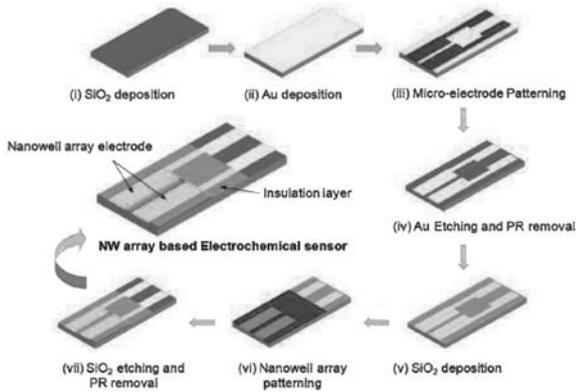
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2019/004259
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 27/327(2006.01)i, G01N 27/406(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 27/327; B82B 3/00; C08G 75/00; C12Q 1/00; C12Q 1/68; G01N 27/416; G01N 33/50; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 27/406 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: biosensor, multi-well, electrode, probe, target material, protein, amperometry		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2015-0118894 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 23 October 2015 See paragraphs [0030]-[0036], [0053]-[0055] and figures 1, 14, 18, 21.	1-9
Y	KR 10-0601999 B1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 19 July 2006 See paragraphs [0034]-[0036] and figure 1.	1-9
A	JP 2005-164388 A (OSAKA INDUSTRIAL PROMOTION ORGANIZATION) 23 June 2005 See paragraphs [0026]-[0029], claim 1 and figures 3(a), 3(b).	1-9
A	KR 10-2013-0121464 A (INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 06 November 2013 See claim 1 and figure 1.	1-9
A	KR 10-2007-0053545 A (SAMSUNG SDI CO., LTD.) 25 May 2007 See claims 1, 2 and figures 1, 2.	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">15 JULY 2019 (15.07.2019)</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">16 JULY 2019 (16.07.2019)</p>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongse-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/004259

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0118894 A	23/10/2015	KR 10-1698988 B1 WO 2015-160085 A1	24/01/2017 22/10/2015
KR 10-0601999 B1	19/07/2006	KR 10-2005-0121191 A	26/12/2005
JP 2005-164388 A	23/06/2005	JP 4497903 B2	07/07/2010
KR 10-2013-0121464 A	06/11/2013	KR 10-1338168 B1	06/12/2013
KR 10-2007-0053545 A	25/05/2007	None	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/004259

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 27/327(2006.01)i, G01N 27/406(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 27/327; B82B 3/00; C08G 75/00; C12Q 1/00; C12Q 1/68; G01N 27/416; G01N 33/50; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 27/406 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 바이오센서(biosensor), 멀티웰(multi-well), 전극(electrode), 프로브(probe), 표적물질(target), 단백질(protein), 암페로메트리(amprometry)

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2015-0118894 A (부산대학교 산학협력단) 2015.10.23 단락 [0030]-[0036], [0053]-[0055] 및 도면 1, 14, 18, 21 참조.	1-9
Y	KR 10-0601999 B1 (삼성전자주식회사) 2006.07.19 단락 [0034]-[0036] 및 도면 1 참조.	1-9
A	JP 2005-164388 A (OSAKA INDUSTRIAL PROMOTION ORGANIZATION) 2005.06.23 단락 [0026]-[0029], 청구항 1 및 도면 3(a), 3(b) 참조.	1-9
A	KR 10-2013-0121464 A (인천대학교 산학협력단) 2013.11.06 청구항 1 및 도면 1 참조.	1-9
A	KR 10-2007-0053545 A (삼성에스디아이 주식회사) 2007.05.25 청구항 1, 2 및 도면 1, 2 참조.	1-9

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:	"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌	"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌	"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌	"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌	
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌	

국제조사의 실제 완료일 2019년 07월 15일 (15.07.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 07월 16일 (16.07.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이현길 전화번호 +82-42-481-8525
---	------------------------------------

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)



국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/004259

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0118894 A	2015/10/23	KR 10-1698988 B1 WO 2015-160085 A1	2017/01/24 2015/10/22
KR 10-0601999 B1	2006/07/19	KR 10-2005-0121191 A	2005/12/26
JP 2005-164388 A	2005/06/23	JP 4497903 B2	2010/07/07
KR 10-2013-0121464 A	2013/11/06	KR 10-1338168 B1	2013/12/06
KR 10-2007-0053545 A	2007/05/25	없음	

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
	G 0 1 N 27/327	3 5 7

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ